昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，July 2007，50(7)：662－666 ISSN 0454-6296

颈双缘姬蜂寄生引起小菜蛾蛹脂肪体形态和超微结构的变化

郦卫弟[1,2]，时 敏[1]，陈学新[1,*]

（1. 浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310029；2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所，杭州 310021）

摘要：采用光学和电子显微镜观察了颈双缘姬蜂 *Diadromus collaris*（膜翅目：姬蜂科）寄生后小菜蛾 *Plutella xylostella*（鳞翅目：菜蛾科）蛹脂肪体形态、超微结构和脂肪细胞的变化。结果表明：被寄生 72 h 后小菜蛾蛹脂肪体结构松散，细胞游离，细胞膜破裂；细胞内营养物质开始被动地消耗；细胞器数量减少，细胞核内染色质状态发生变化。这些现象说明寄生对寄主的脂肪体结构及脂肪细胞产生了明显的影响，这有利于为幼蜂的发育提供营养。

关键词：颈双缘姬蜂；小菜蛾；脂肪体；脂肪细胞；超微结构；寄生

中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2007)07-0662-05

Effects of parasitism by *Diadromus collaris* (Hymenoptera：Ichneumonidae) on morphology and ultrastructure of fat body and adipocytes of host *Plutella xylostella* (Lepidoptera：Plutellidae) pupae

LI Wei-Di[1,2]，SHI Min[1]，CHEN Xue-Xin[1,*] (1. Institute of Insect Sciences，College of Agriculture and Biotechnology，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China；2. Institute of Plant Protection and Microbiology，Zhejiang Academy of Agricultural Sciences，Hangzhou 310021，China)

Abstract：In order to determine the effects of parasitism by *Diadromus collaris* (Hymenoptera：Ichneumonidae) on structure of fat body of host *Plutella xylostella* (Lepidoptera：Plutellidae) pupae，the morphology and ultrastructure of pupal fat body and adipocytes of the diamondback moth，*P*. *xylostella* parasitized by *D*. *collaris* were observed using light and electron microscopy. After 72 h of parasitism，the structure of fat body became loose；the adipocytes were dissociated from fat body；the membrane of adipocyte was torn，its entocyte was consumed passively，the number of apparatus of cell reduced，and the morphology of nuclear chromatin was changed. It is so concluded that parasitism by parasitoid can make host fat body and adipocytes fell to pieces，and this is advantageous for development of parasitoid.

Key words：*Diadromus collaris*；*Plutella xylostella*；fat body；adipocytes；ultrastructure；parasitism

寄生蜂寄生寄主昆虫时，来自寄生蜂雌成蜂的毒液、多分 DNA 病毒（PDV）以及来自幼蜂胚胎的畸形细胞和幼蜂的分泌物质可引起寄主一系列的生理变化，包括免疫能力、发育进程以及营养水平等各方面，这些变化为幼蜂的顺利发育提供保障。

同一寄生蜂-寄主系统中的不同因子以及不同寄生蜂-寄主系统中的同一因子对寄主的生理调控存在着差异。如菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia vestalis* (Haliday) [＝*Cotesia plutellae* Kurdjumov] (Shaw，2003)的 PDV 和毒液对寄主小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫的脂肪体结构完整性不产生影响，而畸形细胞的存在则使脂肪体几乎无完整的细胞结构（白素芬等，2005），此现象在粘虫绒茧蜂 *Cotesia kariyai* 中也有发现（Nakamatsu *et al*.，2002）。

脂肪体是昆虫体内物质贮备和中间代谢的重要组织，是血淋巴中蛋白质、脂类和碳水化合物的主要

基金项目：国家自然科学基金项目（30370959）；国家杰出青年科学基金项目（30625006）；教育部'新世纪优秀人才支持计划'项目（NCET-04-0521）

作者简介：郦卫弟，女，1975 年 6 月生，浙江人，博士，助理研究员，研究方向为昆虫生理生化

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：xxchen@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2007-01-08；接受日期 Accepted：2007-04-05

供给者(Haunerland and Shirk，1995)。总的来说寄生因子引起脂肪体的变化包括对脂肪体发育的影响(Hegazi and Khafagi，2000)、脂肪体结构的破坏作用(Nakamatsu *et al*.，2002；白素芬等，2005)和有关代谢的改变等(Shelby and Webb，1997；Zhang *et al*.，1997；Thompson，2001)。

颈双缘姬蜂 *Diadromus collaris*(膜翅目：姬蜂科)是小菜蛾蛹期的内寄生蜂，同时也是小菜蛾的主要寄生蜂之一，其雌蜂体内只含有毒液这一因子(Li *et al*.，2006)，寄生对寄主小菜蛾蛹脂肪体的组织病理变化未有报道。本研究采用透射电镜的方法观察被寄生后小菜蛾蛹脂肪体的组织结构，旨在进一步明确该蜂调控寄主营养及代谢的生理机制。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

寄主小菜蛾采自杭州郊区菜田在室内续代饲养，饲养方法参考汪信庚和刘树生(1998)方法，在25℃，相对湿度75%及光照14 h的全自动人工气候室内，用30 cm×30 cm×30 cm的养虫笼，将套上塑料袋的菜叶插入盛水的瓶子中，以吸引小菜蛾产卵，收集卵袋，放于甘蓝(京丰一号)植株上，用于小菜蛾的生长。

颈双缘姬蜂采自杭州郊区菜田在室内续代繁殖，并且每年春季补充一定量的雌蜂以保证种群的活力。蜂的室内饲养条件参考汪信庚等(1997)及汪信庚和刘树生(1998)的方法。群体繁蜂时将羽化72 h及交配过的雌蜂以1∶5的比例放入自制的蜂盒中寄生一天内的带茧的小菜蛾新鲜蛹，寄生24 h后将蜂引出，被寄生小菜蛾蛹置于光照16 h、温度25℃、相对湿度75%条件下饲养。

1.2　小菜蛾蛹脂肪体的形态观察

解剖被寄生后72 h的小菜蛾蛹，取出脂肪体，在Leica MZ APO(Leica公司，德国)体视显微镜下观察脂肪体的形态，并用Leica MPS 30(Leica公司，德国)摄像系统进行拍照。以同期未寄生的小菜蛾蛹脂肪体为对照。

1.3　小菜蛾蛹脂肪体的透射电镜样品制备及观察

解剖被寄生后3天的小菜蛾蛹，在国产Motic B系列(Motic公司)解剖镜下取出发育中的幼蜂及寄主的中肠组织。将残余的部分根据透射电镜样品处理的程序进行样品制备(具体步骤见下)，样品一部分用LKB 11800 Pyramitome切片机(LKB公司，瑞典)进行2 μm厚度的切片，并用亚甲基蓝染色，然后用体视显微镜观察；另一部分用于透射电镜样品的切片及观察。以上处理都以同期未被寄生小菜蛾为对照。

透射电镜样品的处理及观察程序：(1) 2.5%戊二醛溶液进行预固定过夜；(2)用0.1 mol/L pH 7.4 PBS漂洗3次，每次15 min；(3) 2%锇酸后固定1 h，再用同样的PBS漂洗3次，每次15 min；(4) 用浓度梯度为50%、70%、80%、90%、95%的酒精梯度脱水，每次15 min，再用纯乙醇处理1次20 min，再用纯丙酮处理1次20 min；(5) 用包埋剂(环氧树脂)与丙酮的混合液(v/v＝3/1)处理样品3 h；(6) 纯包埋剂处理样品过夜，再将处理好的样品包埋起来，70℃加热过夜；(7) 进行切片；超薄切片用柠檬酸和醋酸铀进行双染色；(8) 用JEM-1230(JEOL公司，日本)透射电镜观察。

2　结果

2.1　小菜蛾蛹脂肪体结构的光学形态变化

在体视显微镜下观察小菜蛾蛹脂肪体的形态结构，发现被寄生3天后和同期未被寄生蛹脂肪体的形态存在着较大差异。未被寄生的小菜蛾蛹脂肪体结构完整，紧凑，脂肪体细胞间结合紧密(图1：A)，被寄生后，脂肪体细胞从脂肪体的外周开始游离到寄主的血腔中，整个脂肪体结构松散(图1：B)。

2.2　小菜蛾蛹脂肪体的组织切片观察

通过对脂肪体半薄切片进行亚甲基蓝染色及体视显微镜观察，发现未被寄生的蛹脂肪体组织着色深，并且着色的组织面积大，脂肪体组织结构紧密(图2：A)。被寄生的蛹脂肪体，着色较深的脂肪体组织面积少，仅位于脂肪体中间的一小部分，并且脂肪体组织结构分散(图2：B)。

2.3　小菜蛾蛹脂肪体组织显微结构的变化

通过透射电镜观察，发现未被寄生的小菜蛾蛹脂肪体组织的脂肪体细胞排列整齐，结合紧密，细胞膜结构完整，细胞内的蛋白颗粒和脂类颗粒结构完整，着色深而均匀(图2：C)。细胞内存在较多的线粒体，紧贴于膜结构，如细胞核膜，脂滴膜(图2：D，E)。染色质较松散地分布于核边缘(图2：E)。

被寄生3天后小菜蛾蛹脂肪体细胞的细胞间隙渐渐增大，有的细胞完全游离，细胞膜出现破裂、坏死，呈不完整的状态(图2：F)。细胞内存在大量的溶酶体和过氧化质体，其中过氧化质体侵入蛋白颗

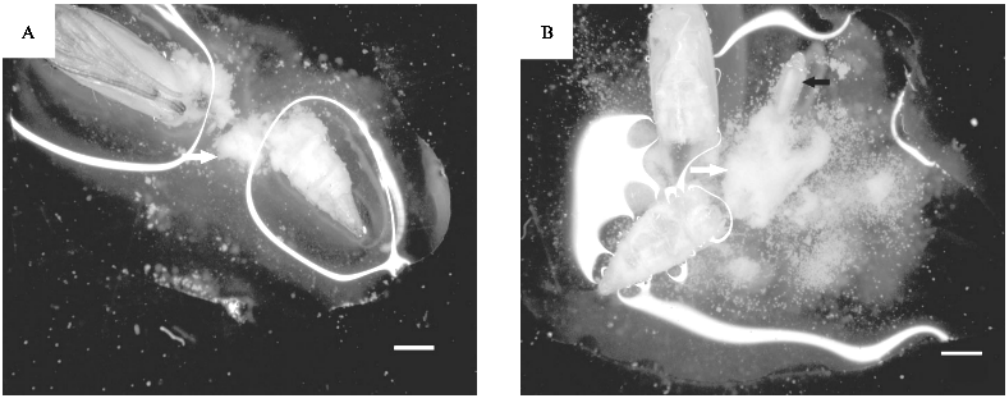

图 1　被寄生前后小菜蛾蛹脂肪体的光学形态变化

Fig. 1　Morphology of fat body from parasitized and unparasitized pupae of *Plutella xylostella* under light microscope

A：未被寄生蛹(对照)Unparasitized pupa (CK)；B：被寄生蛹 Parasitized pupa. 白色箭头所示蛹脂肪体 White arrows indicate host fat bodies；黑色箭头所示为发育中的颈双缘姬蜂幼蜂 Black arrow indicates the developing larvae of *Diadromus collaris*.

粒将蛋白颗粒分解(图 2：G)，部分脂滴也被分解，脂滴的分解方式有两种，一种是内含物直接在颗粒内分解(图 2：H)另一种是大的脂滴分成多个小的结构，脂滴的界膜消失，脂滴再被过氧化质体分解(图 2：I)。另外由于脂肪体细胞膜的破裂，脂肪体内的物质被释放到细胞外的空间中(图 2：H，I)。同时被寄生后糖元也有所增加，细胞质内可见到更多的分散的糖元颗粒(图 2：J)。而未被寄生的细胞质内糖元颗粒少且集中(图 2：D)。

与未被寄生的细胞核相比，虽然被寄生后细胞核仍然是完整的，但核内小染色质块增多，有的小染色质块被分解(图 2：K，F)。而未被寄生的细胞核的染色质结构较松散，未发现有分解的现象(图 2：E)。被寄生后的脂肪体细胞内线粒体数量大大减少。在未被寄生的细胞内发现有较多的线粒体分布于膜结构(细胞膜和核膜)的附近。而被寄生后线粒体几乎未被发现，并且对存在的线粒体结构观察发现，线粒体的结构受到一定的影响，内脊不明显或消失(图 2：L)。

3　讨论

从实验结果来看，颈双缘姬蜂寄生引起小菜蛾蛹脂肪体组织结构的破坏，包括脂肪体组织的分解和细胞膜的破裂。同时寄生也引起细胞内营养物质的分解，包括蛋白颗粒被过氧化质体分解，脂滴与糖元分解，溶酶体增多，以及细胞亚显微结构的影响，如线粒体数量的减少和形态的变化。

昆虫的蛹期是一个外表静止、内部却发生着激烈变化的时期。各种幼虫期的器官组织解体，重新形成成虫期的组织器官，包括脂肪细胞亚细胞结构及生理功能的改变基础上的细胞变态(Nation，2002)。或许上述脂肪体组织解体和脂肪细胞细胞器结构及数量的改变与脂肪细胞的变态有关，而寄生因子则是引起脂肪体变态加速的因子。

细胞内过氧化质体侵入蛋白颗粒表明细胞内的贮备物质被动地用于生命活动。这一现象与摘除脑后的蓖麻蚕蛹的脂肪体细胞的变化一致(刘玉滨和钟香臣，1991)，由于摘除脑后，激素分泌受到抑制使蛹的发育受到抑制，而此时蛹的细胞还处于活性状态，因此还需要能量的消耗。被寄生后 72 h 的小菜蛾蛹体内颈双缘姬蜂幼蜂正处于发育阶段，蛹血淋巴内的营养物质已不够幼蜂生长所用，就需要动用脂肪体内的营养。在被粘虫绒茧蜂 *C. kariyai* 寄生的粘虫 *Pseudaletia separata* 体内，也有证据证明是发育中的幼蜂胚胎的畸形细胞分泌的金属蛋白酶和磷脂酶分解脂肪体组织和细胞，利用寄主的脂肪体作为能量的来源(Nakamatsu *et al*.，2002)。但是到目前为止我们还不能确定是哪一因子在小菜蛾蛹脂肪体的组织结构变化中起作用，或许是寄生蜂的毒液，或许是发育中的幼蜂所分泌的某些物质引起脂肪体组织结构的变化，因为在多种寄生蜂的毒液中发现有透明质酸酶和磷脂酶的活性(Doury *et al*.，1997；Down *et al*.，1999)，这些酶在分解生物组织方面都有作用。同时有些寄生蜂幼蜂分泌的物质也具有分解组织活性的物质(Nakamatsu and Tanaka，2003，2004)。而颈双缘姬蜂是一类在幼蜂发育过程中不产生畸形细胞的类群，因此需要对毒液及幼蜂分泌物质的活性进一步地分析，以明确它们在利用寄主营养方面的功能。

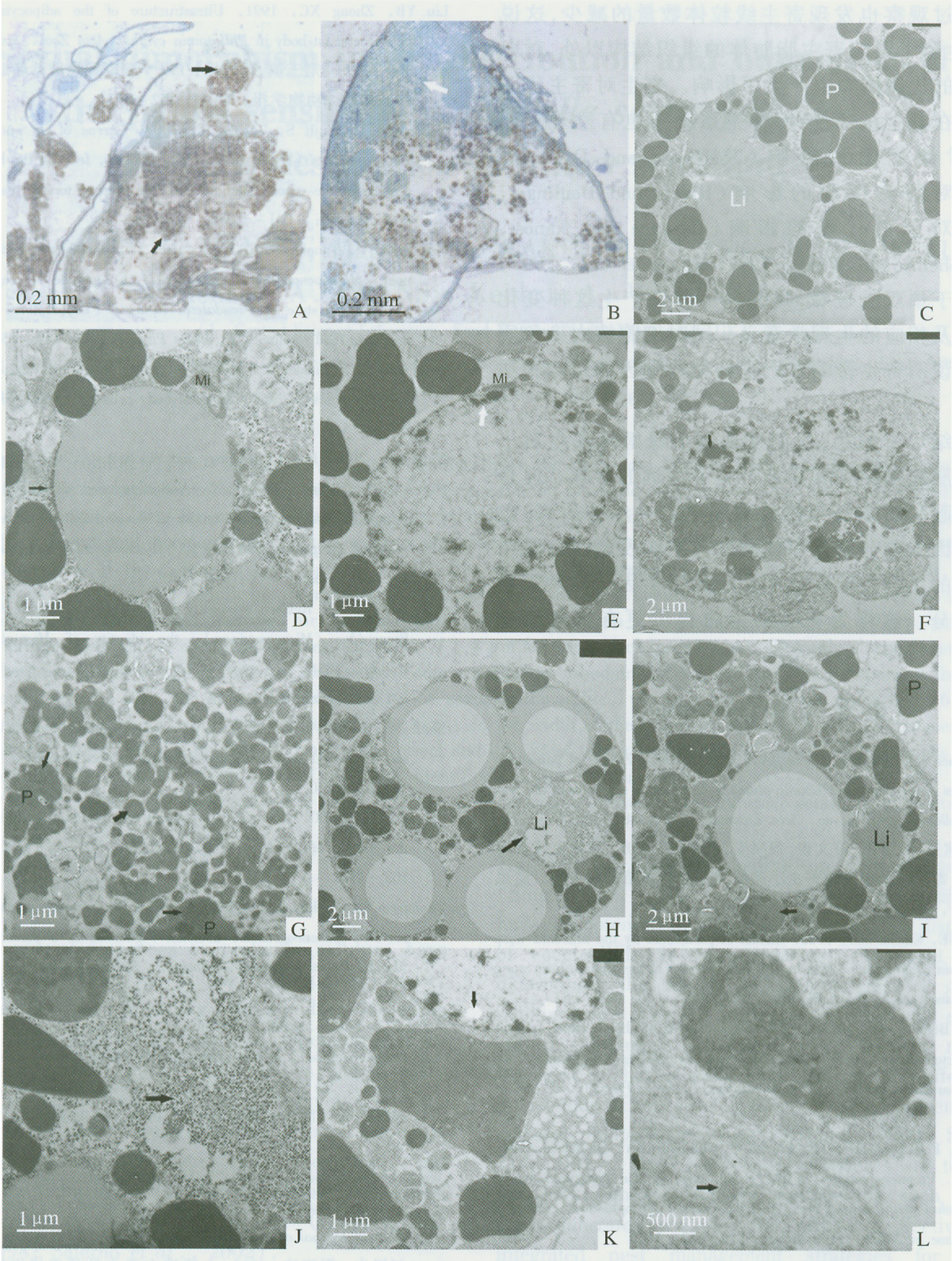

图 2　被寄生前后小菜蛾蛹脂肪体组织的半薄切片(A ~ B)及超微结构 (C ~ L) 变化

Fig. 2　Semi-thin slices (A – B) of fat body and ultrastructure (C – L) of adipocytes from parasitized and unparasitized pupae of *Plutella xylostella*

A：未被寄生蛹 Unparasitized pupa；B：被寄生蛹 Parasitized pupa；白色箭头所示被寄生后寄主脂肪体的外周脂肪细胞 White arrows indicate the lipocyts in the outer of fat body of parasitized host pupa；黑色箭头所示未被寄生寄主的脂肪细胞 Black arrows indicate the lipocyts in the outer of fat body of unparasitized host pupa. C ~ E：未被寄生蛹脂肪细胞的超微结构 Unparasitized pupae；F ~ L：被寄生蛹脂肪细胞的超微结构 Parasitized pupae；Li：脂滴 Lipid particle；P：蛋白颗粒 Protein particle；Mi：线粒体 Mitochondria；黑色箭头所示糖原颗粒(D,J)、染色质块(F,K)、脂滴(I)和线粒体(L) Black arrows indicate hepatin particle (D, J), nuclear chromatin (F, K), lipid particle (I) and mitochondria (L)；白色箭头所示染色质块(E) White arrow indicates nuclear chromatin (E).

通过观察也发现寄主线粒体数量的减少，这说明，寄生除了影响寄主脂肪体的组织结构以外，对寄主细胞的代谢能力也产生了影响。寄生对寄主代谢的影响在其他的寄生蜂-寄主系统中也有发现。如寄生对糖代谢的影响（Thompson and Dahlman，1999），对脂类代谢的影响（Rivers and Denlinger，1995），对蛋白代谢的影响（Beckage and Kanost，1993；Shelby and Webb，1997；Zhang *et al*.，1997）等。对于颈双缘姬蜂，我们也不明确产生这种变化的机理及相应的生理学意义。同时细胞核内染色质的变化说明寄生影响了寄主的某些基因的结构和功能。

总结以上结果，我们发现颈双缘姬蜂寄生对小菜蛾蛹脂肪体结构和功能产生了深远的影响。但是对于引起脂肪体变化的机理还需进一步的研究，包括寄生因子的分解作用使脂肪体组织及脂肪细胞结构变化的机理以及明确起作用的寄生因子的种类和具体成分。这将为害虫的生防提供更有价值的方法。

参考文献（References）

Bai SF，Chen XX，Fu WJ，Cheng JA，He JH，2005. Effects of parasitism factors of the parasitoid *Cotesia plutellae* on fat body structure of the host *Plutella xylostella* larvae. *Acta Entomol. Sin.*，48（2）：166－171. ［白素芬，陈学新，符文俊，程家安，何俊华，2005. 菜蛾盘绒茧蜂主要寄生因子导致的寄主小菜蛾幼虫脂肪体结构的变化. 昆虫学报，48（2）：166－171］

Beckage NE，Kanost MR，1993. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregate* on host hemolymph proteins of the tobacco horn worm *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，23：643－653.

Doury G，Bigot Y，Periquet G，1997. Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary secretions of the ectoparasitoid wasp *Eupelmus orientalis*. *J. Insect Physiol.*，43：69－81.

Down RE，Ford L，Mosson HJ，Fitches E，Gatehouse JA，Gatehouse AMR，1999. Protease activity in the larval stage of the parasitoid wasp，*Eulophus pennicornis*（Nee）（Hymenoptera：Eulophidae）：effect of protease inhibitors. *Parasitology*，119：157－166.

Haunerland NH，Shirk PD，1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annu. Rev. Entomol.*，40：1 421－1 451.

Hegazi EM，Khafagi WE，2000. Possible bases of pseudoparasitism in *Spodoptera littoralis* larvae stung by *Microplitis rufiventris*. *J. Insect Physiol.*，46：1 267－1 274.

Li WD，Yu RX，Chen XX，He JH，2006. Venom gland of the ichneumonid *Diadromus collaris*：morphology，ultrastructure and age-related change. *Insect Science*，13（2）：137－143.

Liu YB，Zhong XC，1991. Ultrastructure of the adipocytes of pupal perivisceral fat-body in *Philosamia cynthi*. *Acta Zool. Sin.*，37（4）：352－357. ［刘玉滨，钟香臣，1991. 蓖麻蚕蛹脏器脂肪体的细胞超微结构. 动物学报，37（4）：352－357］

Nakamatsu Y，Fujii S，Tanaka T，2002. Larvae of an endoparasitoid，*Cotesia kariyai*（Hymenoptera：Braconidae），feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *J. Insect Physiol.*，48：1 041－1 052.

Nakamatsu Y，Tanaka T，2003. Venom of ectoparasitoid，*Euplectrus* sp. near *plathypenae*（Hymenoptera：Eulophidae）regulates the physiological state of *Pseudaletia separata*（Lepidoptera：Noctuidae）host as a food resource. *J. Insect Physiol.*，49：149－159.

Nakamatsu Y，Tanaka T，2004. Venom of *Euplectrus separatae* causes hyperlipidemia by lysis of host fat body cells. *J. Insect Physiol.*，50：267－275.

Nation JL，2002. Insect Physiology and Biochemistry. CRC Press. 485 pp.

Rivers DB，Denlinger DL，1995. Venom-induced alterations in fly lipid metabolism and its impact on larval development of the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis*（Walker）（Hymenoptera：Pteromalidae）. *J. Invertebr. Pathol.*，66：104－110.

Shaw MR，2003. Revised synonymy in the genus *Cotesia*（Hymenoptera：Braconidae：Microgastrinae）：the identity of *Microgaster vestalis* Haliday，1834，as a senior synonym of *Apanteles plutellae* Kurdjumov，1912. *Entomol. Gazette*，54：187－189.

Shelby KS，Webb BA，1997. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，27：263－270.

Thompson SN，2001. Parasitism enhances the induction of glucogenesis by the insect，*Manduca sexta* L. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*，33：163－173.

Thompson SN，Dahlman DL，1999. Blood sugar formation due to abnormally elevated gluconeogenesis：aberrant regulation in a parasitized insect，*Manduca sexta* Linnaeus. *Biochim. Biophys. Acta*，1 454：133－142.

Wang XG，Liu SS，1998. Bionomics of *Diadromus collaris*（Hymenoptera：Ichneumonidae），a major pupal parasitoid of *Plutella xylostella*. *Acta Entomol. Sin.*，41（4）：389－395. ［汪信庚，刘树生，1998. 小菜蛾蛹主要天敌颈双缘姬蜂的生物学. 昆虫学报，41（4）：389－395］

Wang XG，Liu SS，Cheng XB，1997. Host age preference and suitability of *Diadromus collaris*，a major pupal parasitoid of *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Biological Control*，13（3）：101－105. ［汪信庚，刘树生，程晓波，1997. 小菜蛾主要天敌颈双缘姬蜂对寄主蛹龄的选择性和适合性. 中国生物防治，13（3）：101－105］

Zhang D，Dahlman DL，Järlfors UE，1997. Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. *J. Insect Physiol.*，43：577－585.

（责任编辑：黄玲巧）